

Serratia marcescens のクロールヘキシジン耐性菌の育成とその対応策について

上 田 勝・柴 田 元 雄

熊本大学薬学部生物薬品製造学教室

等 泰 三・三 浦 昭 代

久留米大学医学部附属病院薬剤部

(昭和 55 年 9 月 22 日受付)

1. 試験管内で *Serratia marcescens* の CH 耐性菌を育成し、原株の MIC 15.6 $\mu\text{g/ml}$ に対し、最終的に MIC 10,000 $\mu\text{g/ml}$ の耐性菌を育成した。
2. 緑膿菌や変形菌も耐性獲得については *Serratia* と同様の傾向を示したが、大腸菌はきわめて耐性化しにくかった。
3. *Serratia* の場合、獲得した CH 耐性能は CH を含有しない培地に継代培養しても比較的安定に維持された。
4. 今回育成した *Serratia* の CH 耐性菌には塩化ベンザルコニウムや塩化ベンゼトニウムの第 4 級アンモニウム系消毒剤が有効であった。

クロールヘキシジン¹⁾は、グラム陰性桿菌に優れた抗菌力をもち、皮膚炎などの副作用も少なく、血清や唾液などによる効力の減退が少ない点で病院などで常用される消毒剤の一つであるが、本剤に対する耐性菌の出現も昨今見聞するところである。*Pseudomonas* 属細菌による尿路感染症の流行例²⁾や一般消毒常用濃度である 0.05% 液、さらに 0.1% 液中でも生存可能な菌の存在例³⁾もある。

近年、院内感染の主要因菌としては、グラム陰性桿菌である緑膿菌、セラチア、変形菌および大腸菌などがあげられるが、これらは抗生物質の濫用に起因するところが大きい、現用の消毒剤の使用法にも問題があると考えられる。

一方、消毒剤に関するもう一つの問題として環境汚染があげられる。消毒剤は使用後、廃水として下水処理場で処理されるが、希釈されても抗菌作用が強力なことから活性汚泥法などの生物学的処理において、汚泥そのものの菌叢を変えたり、不活化したりする可能性がある。この種の環境浄化の観点から諸種消毒剤の分解についての検討もなされている⁴⁾が、一般にジグアニド系であるクロールヘキシジンは分解しにくい⁵⁾といわれている。

著者らは、病院環境汚染の微生物学的考察と題して研究を開始し、代表的消毒剤であるクロールヘキシジンの行方を追求している。クロールヘキシジンにより諸種の微生物が殺菌されるのは当然であるが、果たして微生物はクロールヘキシジンをどのように分解するかを知るこ

とは興味ある問題である。この問題の解決のためにはクロールヘキシジン耐性菌を育成し、彼らによるクロールヘキシジンの分解過程を追求することが望ましいと考えられた。

本報では、その第 1 段階として主に *Serratia marcescens* のクロールヘキシジン耐性菌の育成、耐性度の安定性さらにこの耐性菌に対する対応策について検討した結果について述べる。

I. 材料および方法

1. 使用薬剤

ヒピテン・グルコネート液 (chlorhexidine digluconate, 20% (w/v) 溶液, ICI フェーマ(株)-住友化学工業製)。以下本薬剤を CH と略。

塩化ベンザルコニウム液 10% (w/v) (山善薬品製)。

塩化ベンゼトニウム原末 (片山化学工業製)。

2. 使用培地

液体培養には Brain Heart Infusion Bouillon (以下 BHIB と略) を、また固体培養には Brain Heart Infusion Agar (以下 BHIA と略) (いずれも日本製薬製) を用いた。

3. 使用菌株

Serratia marcescens IFO 3046

Escherichia coli IFO 3301

Proteus vulgaris IFO 3167

Pseudomonas aeruginosa IFO 3923

4. CH の効力検定法 :

消毒剤の効力検定法には石炭酸法をはじめとして種々あるが、ここでは最小生育阻止濃度法 (Minimum Inhibitory Concentration 以下 MIC) で検定した。

CH 20% 溶液を 5 倍希釈液と定め、殺菌精製水を用いて各 2 倍濃度の 2 倍希釈系列をつくり 1 ml ずつアルミキャップ付殺菌試験管に分注する。これに 2 倍濃度に調製した BHIB 培地各 1 ml を加し、混和後、OD₆₀₀ で 0.15* に調整した菌懸濁液を注射器で 1 滴ずつ接種し、37°C 24 時間培養後、菌の増殖の有無で MIC を判定する。

CH 4,000 倍希釈以下の高濃度では CH は BHIB 培地と混濁を生じ菌の増殖の有無の判定が困難である。このような場合には新たに BHIB に 1 白金耳量移植し、さらに 24 時間培養後、増殖の有無を判定する。これを便宜上 p-MBC (pseudo Minimal Bactericidal Concentration) と称している。

5. CH 耐性菌の育成法

まず常法どおり各試験菌の MIC を検定し、希釈系列上生育した範囲内で CH 濃度が最も高い試験管より、高濃度の試験管に 2 白金耳量ずつ接種して 37°C、菌種により 24 ないし 72 時間培養する。増殖の認められた最

* 検定培地中での生菌数は *Serratia* の場合 8×10^5 /ml, 大腸菌の場合で 7.5×10^5 /ml 程度である。

小希釈倍数 (つまり最高濃度) の試験管から同要領で順次高濃度へ移植して耐性菌を育成する。

最終生存濃度の試験管より BHIA 斜面培地へ移植して 37°C, 24 時間培養後 4°C で保存する。

II. 結 果

1. CH 耐性菌の育成

Serratia marcescens について試験管内で耐性菌を育成した結果を Table 1 に示す。本菌の CH に対する MIC は当初 15.6 μ g/ml (64,000 希釈単位) と検定された。生育の認められた最小希釈倍数 128,000 の試験管より高濃度の CH を含む培地に順次植え継ぐと、通常 2 ~ 3 回の移植、日数にして 6 日間で MIC 10,000 μ g/ml (100 希釈単位), 最高耐性濃度 5,000 μ g/ml の耐性菌が得られる。これを CH を含有しない BHIA 斜面に移植後 37°C, 24 時間培養して *S. marcescens* CH-200 R とした。

本分離株は、培養上ならびに顕微鏡的所見では原料と相異は認められなかった。

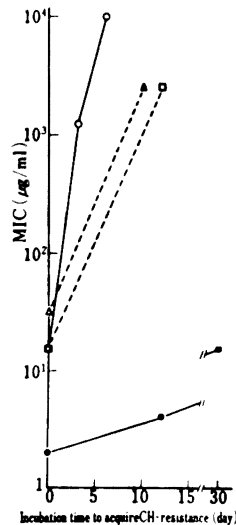
同様の方法により、大腸菌、変形菌および緑膿菌について比較検討した結果を図示すると Fig. 1 のようになる。4 菌種のうち、CH 耐性獲得速度は *Serratia* が最も速く、変形菌や緑膿菌がそれに次いで速い。一方、大腸菌は、他の報告⁶⁾ にも見られるように、当初の MIC

Table 1 Process of acquisition of CH-resistance by *Serratia marcescens*

Dilution unit	MIC (μ g/ml)	Incubation time (day) ¹⁾				
		0	2	3	5	6
100	10,000	-	* ²⁾	-	*	-
200	5,000	-	*	-	*	+
400	2,500	-	*	-	*	+
800	1,250	-	*	-	*	+
1,000	1,000	-	*	+		
2,000	500	-	*	+		
4,000	250	-	*	+		
8,000	125	-	+			
16,000	62.5	-	+			
32,000	31.3	-	+			
64,000	15.6	-	+			
128,000	7.8	+				
256,000	3.9	+				
No CH	0	+				

1) Time to acquire CH resistance.
 2) * Higher CH concn. made precipitate with BHIB, so CH-tolerated concn. was determined by p-MBC method. (See the methods)
 + : Growth observed, - : growth not observed.

Fig.1 Diagram to show acquisition of CH-resistance by Gram-negative rods



○—○ *Serratia marcescens*
 △.....△ *Proteus vulgaris*
 □.....□ *Pseudomonas aeruginosa*
 ●—● *Escherichia coli*

Table 2 Stability of CH-resistance

	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
MIC of prototroph ($\mu\text{g/ml}$)	15.6	31.3	15.6	2
Final tolerated concn. ($\mu\text{g/ml}$)	10,000	2,500	2,500	15.6
MIC of resistant strain ($\mu\text{g/ml}$)	2,500	1,250	1,250	2
Acquisition degree of CH resistance	160	40	80	1
Stability of resistance ($\mu\text{g/ml}$)	F ₁ 2,500 F ₂ 2,500 F ₃ 2,500 F ₄ 1,250	F ₁ 1,250 F ₂ 500	F ₁ 1,250 F ₂ 500	F ₁ 2

1 $\mu\text{g/ml}$ (1,024,000 希釈単位) から 15.6 $\mu\text{g/ml}$ (64,000 希釈単位) まで耐性化するのに約1か月を要し、CH にきわめて耐性化しにくいことが明らかとなった。

2. CH 耐性の安定性

Serratia に関しては、その後 CH 10,000 $\mu\text{g/ml}$ でも生育する CH 耐性菌を分離できたが、これらを前述のように CH を含有しない BHIA 斜面に継代培養後、改めて MIC を検定すると Table 2 のようになる。耐性菌の示す MIC を原株の MIC で除したものを耐性獲得度として表示すると *Serratia* は実に原株の 160 倍の耐性を獲得したこと (耐性濃度 2,500 $\mu\text{g/ml}$, %表示で 0.25%) になり、院内での CH の常用濃度 0.05% でも生育できることを表わしている。

さらにやっかいなことには、一度獲得した耐性は比較

的に安定であるということである。耐性菌から毎日新たな BHIA 斜面に継代培養した F₁ から F₆ について、それぞれの MIC を検定すると表のように CH 耐性能は比較的安定に維持されている。

変形菌や緑膿菌については、検討不十分であるが両者とも MIC が F₁ で、1,250 $\mu\text{g/ml}$, F₂ で 500 $\mu\text{g/ml}$ となり耐性が減弱の傾向を示している。

一方、大腸菌に関しては、耐性を獲得しにくいことは前述のとおりであるが、長日時を要してやっと育成した 64,000 R も CH を含有しない斜面寒天に移植すると、ただちに原株の MIC にもどることが明らかとなった。このことに関連して、新たに育成した 64,000 希釈単位の大腸菌を洗浄菌体にして MIC を検定すると同程度の耐性を示すことから、大腸菌の CH 耐性能は、本消毒剤

Table 3 Effect of quaternary ammonium antiseptics on CH-resistant *Serratia*

Dilution unit	$\mu\text{g/ml}$	Benzalkonium-Cl				Benzethonium-Cl	
		p*	CH-100R			p*	CH-100R
			F ₁	F ₂	F ₃		
1,000	1,000	—	—	—	—	—	—
2,000	500	—	—	—	—	—	—
5,000	200	—	—	—	—	—	—
10,000	100	—	—	—	—	—	—
20,000	50	—	—	—	—	—	—
50,000	20	—	—	—	—	+	+
100,000	10	+	+	+	+	+	+
200,000	5	+	+	+	+	+	+
Control	0	+	+	+	+	+	+
MIC ($\mu\text{g/ml}$)		20	20	20	20	50	50
MIC to CH (〃)		15.6	2,500	2,500	2,500	15.6	2,500

* P : Prototroph.

+ : Growth observed, — : growth not observed

存在下でのみ維持されるものと考えられる。

3. CH 耐性菌に及ぼす第4級アンモニウム系消毒剤の影響

CH にかくも容易に耐性を獲得する *Serratia* にどう対処すべきかについて CH 耐性菌に及ぼす第4級アンモニウム系消毒剤である塩化ベンザルコニウムおよび塩化ペンゼトニウムの影響について検討した。

使用菌株は *Serratia* 原株 (Prototroph) と、CII 100 R から継代培養して得られる F_1 , F_2 および F_3 (F_4) について WAKSMAN の希釈法に準じた希釈系列を用いて検定した結果を Table 3 に示す。CH に強い耐性を示す 100 R の継代培養株は塩化ベンザルコニウムや塩化ペンゼトニウムに対しては、原株と全く同じ感受性を示すことが明らかとなった。従って、院内での常用消毒剤を1種類に限定せず、異なる2種類の消毒剤で少なくとも2度消毒するか、あるいは一定期間ごとに消毒剤の交互使用を実施することにより消毒剤に起因する院内感染は予防できると考えられる。

III. 考 察

PRINCE らは *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* および *Salmonella* に属する6菌株について CH 耐性獲得を調べ、前三者に属する菌株は5~8回の移植により耐性化し、とくに *Serratia marcescens* は20代の継代移植により当初の MIC 8 $\mu\text{g/ml}$ から 2,048 $\mu\text{g/ml}$ へ、すなわち耐性獲得度として256倍を示す耐性菌を分離し、このものは塩化ベンザルコニウムに“交叉耐性”をがしボビドノヨードには交叉耐性を示さないと述べている。

今回の著者らの実験結果では耐性獲得の過程は PRINCE らの報告結果を首肯できるが、塩化ベンザルコニウムに対する交叉耐性は認められなかった。これは同じ *Serratia marcescens* といえども菌株の相違によるものと考えられる (PRINCE らの院内分離株 GBL 104 に対し著者らが使用した菌株 No. が IFO 3046)。

五島らは常用消毒剤のグラム陰性桿菌の臨床分離株に対する殺菌作用を調べ、常用消毒剤の効力に関して、

一般に菌種間並びに菌株間の差が著しいこと、また、とくに *Pseudomonas cepacia* には CH はほとんど無効であると述べている。

大腸菌は予想に反し耐性獲得の現象が顕著でなかったが、その他にも、たとえば虫歯の主因菌である *Streptococcus mutans* は CH に対して耐性を獲得しないという報告例⁹⁾もある。

今回の *Serratia* のように CH に対しての耐性獲得速度がきわめて速く、かつ獲得した耐性が安定であることは驚くべきことであり院内の消毒剤の使用に関して注意を喚起すべく報告するものである。

耐性の安定性に関連して、最近、同種の実験をくり返して20代まで継代培養を試みそれらの安定性を検定した結果、 F_0 で MIC 1,250 $\mu\text{g/ml}$ (800 希釈単位)、 F_{11} および F_{20} で MIC 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (1,000 希釈単位) という結果を得ており、獲得耐性がさらにきわめて安定であることを把握している。

著者らは CH 耐性化のメカニズムや CH の分解経路についても検討中であるが、CH と培養することにより細胞質膜成分と考えられる炭素数 16 のパルミチン酸を主成分とする8種類の脂肪酸が漏出する事実も見出しているので追って報告する。

文 献

- 1) DAVIES, G. E. et al.: Brit. J. Pharmacol., 9:192, 1954
- 2) MITCHELL, R. G. et al.: Lancet 1: 793, 1966
- 3) BURDON, D. W. & J. L. WHITBY: Brit. Med. J., 2: 153, 1967
- 4) 藤原元典, 他: 日本衛生学会, 昭和 53 年会講演要旨集, p.43
- 5) 高麗寛紀, 他: 防菌防黴 6: 109, 1978
- 6) 佐野 肇, 他: Chemotherapy 9: 321, 1961
- 7) PRINCE H. N. et al.: J. Pharmaceut. Sci., 67: 1629, 1978
- 8) 五島達智子, 他: 臨床病理 XXV, 684, 1977
- 9) 有田正俊, 他: 口腔衛生学会雑誌 24: 58, 1974

IN VITRO ISOLATION OF CHLORHEXIDINE-RESISTANT STRAIN FROM
SERRATIA MARCESCENS AND ITS COUNTERMEASURE

MASARU UYEDA, AKIYO MIURA*, MOTOO SHIBATA and TAIZO HITOSHI*

Laboratory of Medicinal Microbiology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 862, Japan

* Department of Pharmacy, School of Medicine, Kurume University

Serratia marcescens became resistant to chlorhexidine (abbrev. as CH) after three transfers *in vitro*. Minimum inhibitory concentration of the CH-resistant strain was 10,000 $\mu\text{g/ml}$ compared with 15.6 $\mu\text{g/ml}$ of the parent strain.

CH-resistance such acquired was stable even after drug-free transfers.

Countermeasure against the CH-resistant strain was examined, and as a result the quaternary ammonium antiseptics such as benzalkonium chloride and benzethonium chloride were effective for the resistant strain and its filial strains.

In addition, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris* showed the same tendency to acquire CH-resistance as *Serratia marcescens*. *Escherichia coli*, however, did not become resistant to chlorhexidine.